

PENGARUH METODE STERILISASI DAN KONSENTRASI FILTRAT BAKTERI ENDOFIT TANAMAN TEBU UNTUK MENGENDALIKAN PENYAKIT BLENDOK (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Savulescu 1947)

Influence of Sterilization Methods and Filtrate Dosages Endophytic Bacterial of Sugarcane to Control Leaf Scald (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Savulescu 1947)

Astri Afriani*, Hasanuddin dan Lisnawita

Program Studi Magister Agroekoteknologi. Fakultas Pertanian USU. Medan 20155

*Corresponding author: astriafriani19@gmail.com

ABSTRACT

Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) is an important pathogen of sugar cane in Indonesia and cause significant losses at several main sugarcane plantation. Some control measures, e.i. bactericides, smeared lysol 20% or alcohol 70% on cutting knife seedling for disinfectant, and hot water treatment at 50 minutes on 52,5°C, have not given satisfactory result in managing this leaf scald in sugarcane on the field. Biological control with filtrate of endophyts bacterial were alternative to biocontrol agents *Xanthomonas albilineans*. The objectives of this research were to determine: influence of sterilization methods and endophytic bacterial filtrate dosages of sugarcane to control leaf scald (*Xanthomonas albilineans*). This research was conducted in Pythopathology Laboratory at Faculty of Agriculture University of North Sumatra from April until December 2014. This research had done with Completely Randomized Design (CRD) with three factor: 1. type of endophytic bacterial filtrates: filtrate of B2, B7 and B9 Sterilization methods of endophytic bacterial filtrate: control (no sterilization), Sterilization by autoclave and Sterilization by filter membrane, 3. Dosage of endophytic filtrate with four level: 0,1%, 0,01%, 0,001% and 0,0001%. The result showed: 10 isolate endophytic bacteria had exploration were: B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, and B10. Three isolate had clear zone on petridish ≥ 20 mm *in vitro* testing is B9, B7, and B2. The results showed that the membrane filter sterilization method was better when compared to autoclave sterilization, namely: the highest inhibitory zone diameter of endophytic bacteria in the treatment of B9 filtrate with a membrane filter sterilization method 0,1% at 3 day after inoculation that was equal to 23.00 mm.

Key words : endophytic, bacterial, sterilization method, *Xanthomonas albilineans*, sugarcane

ABSTRAK

Penyakit blendok (*Xanthomonas albilineans*) pada tanaman tebu merupakan penyakit penting yang dihadapi oleh perkebunan tebu di Indonesia. Beberapa teknik pengendalian telah dilakukan, seperti penggunaan bakterisida, pisau untuk memotong bibit diolesi lisol 20% atau alkohol 70% sebagai desinfektan dan perawatan air panas (*hot water treatment*) selama 50 menit dengan suhu 52,5°C namun teknik pengendalian tersebut belum efektif untuk mengendalikan patogen ini. Pengendalian biologi dengan filtrat bakteri endofit sebagai agens biokontrol merupakan alternatif pengendalian *Xanthomonas albilineans*. Penelitian ini bertujuan mendapatkan metode sterilisasi dan konsentrasi filtrat bakteri endofit tanaman tebu untuk mengendalikan penyakit blendok. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara pada bulan April sampai Desember 2014. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan

3 faktor yaitu: 1. Filtrat bakteri endofit yang terdiri atas 3 jenis filtrat yaitu: Filtrat B2, B7, dan B9, 2. Metode sterilisasi filtrat yaitu: tanpa sterilisasi (kontrol), autoclave, dan membran filter dan 3. Konsentrasi filtrat bakteri endofit: 0,1%, 0,01%, 0,001% dan 0,0001%. Hasil eksplorasi kesepuluh bakteri tersebut adalah B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, dan B10. Isolat yang menghasilkan zona bening ≥ 20 mm pada pengujian *in vitro* adalah B9, B7, dan B2. Hasil penelitian menunjukkan metode sterilisasi membran filter lebih baik bila dibandingkan dengan sterilisasi autoclave yaitu: diameter zona hambat tertinggi dari bakteri endofit pada perlakuan filtrat B9 dengan metode sterilisasi membran filter konsentrasi 0,1% pada 3 hsi yaitu sebesar 23,00 mm.

Kata Kunci: endofit, bakteri, metode sterilisasi, *Xanthomonas albilineans*, tebu.

PENDAHULUAN

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) termasuk dalam suku Gramineae atau Poaceae yaitu jenis rumput-rumputan dan hanya tumbuh di daerah beriklim tropis termasuk Indonesia (Indriani & Sumiarsih, 1992). Tanaman tebu merupakan sumber gula dimana saat ini produksi gula nasional masih lebih rendah dari kebutuhan yang ada (Statistik Perkebunan Indonesia Komoditas Tebu 2013 – 2015).

Pemerintah telah menargetkan swasembada gula pada tahun 2014 untuk memenuhi kebutuhan gula nasional sebesar 5,7 juta ton, sementara produksi nasional tahun 2012 masih 1,85 juta ton (Dirjenbun, 2011) dengan rendemen berkisar 7,1-7,9 (Yulianti, 2012). Penurunan produksi gula nasional tahun terakhir ini salah satunya disebabkan oleh penyakit (BPPT, 2007).

Diantara penyakit penting pada tanaman tebu adalah penyakit blendok yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas albilineans*. Penyakit ini dapat menyebabkan kerugian hasil yang besar di banyak lokasi. Di Guadeloupe, penyakit blendok menyebabkan pengurangan hasil sebesar 80-98% serta mempengaruhi komposisi gula dan kemurnian gula (Rott *et al.* 2009). Di Indonesia penyakit blendok terdapat di Jawa dan Sumatera. Penyakit ini terdapat di semua negara penghasil tebu (Semangun, 2008).

Penyakit ini ditandai dengan gejala serangan timbulnya klorosis pada daun

yang mengikuti alur pembuluh. Jalur klorosis ini lama-lama menjadi kering. Penyakit blendok terlihat kira-kira 6 minggu hingga 8 minggu setelah tanam. Jika daun terserang berat, seluruh daun bergaris-garis hijau dan putih (Pieretti *et al.* 2009).

Penularan penyakit terjadi melalui perantaraan alat yang digunakan untuk memotong stek tebu yang tidak steril, tertiup angin dan hujan sehingga harus dilakukan pergiliran tanaman agar mengurangi timbulnya penyakit (Birch, 2001). Penerapan teknik-teknik pengendalian lainnya seperti menanam varietas tahan penyakit, solarisasi tanah (Widodo dan Suheri, 1995) dan penggunaan agens hayati diantaranya mikroorganisme antagonis seperti jamur dan bakteri endofit (Azevedo *et al.* 2000, Strobel *et al.* 2004).

Bakteri endofit merupakan mikroba yang hidup dan berkembang di dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya, menunjang pertumbuhan dan dapat menjadi benteng pertahanan tanaman untuk melawan penyakit. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (Tan & Zou, 2001).

Interaksi diantara tanaman tebu dan bakteri endofit yang sangat baik, biasanya lebih banyak digunakan sebagai pupuk organik (Widayati *et al.*, 2007). Pada tanaman tebu misalnya, ditemukan mikroba endofit antara lain *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* sp., *Klebsiella* sp., dan *Pseudomonas* sp. Khusus untuk tanaman tebu *G. diazotrophicus* sudah banyak digunakan di perkebunan tebu di Brasil dan India. Populasi bakteri selain berfungsi menyehatkan tebu, *G. diazotrophicus* juga dapat menambat nitrogen dari udara. Begitu pula dengan *Azospirillum* sp. dan *Klebsiella* sp. Sedangkan *Pseudomonas* sp. berfungsi melarutkan fosfat. Bakteri penambat nitrogen tersebut juga mampu menghasilkan fitohormon Indole Acetic Acid (IAA), yang berfungsi sebagai hormon pertumbuhan (Widayati, 2011).

Sejumlah bakteri endofit diantaranya *G. diazotrophicus* dan *Herbaspirillum rubrisubalbicans* telah dilaporkan memiliki metabolit sekunder golongan tannin dan alkaloid yang dapat menolak kehadiran patogen tular tanah (Widayati, 2011). Hal yang sama juga dilaporkan oleh Widayati *et al.* (2007) ditemukan mikroba endofit antara lain *G. diazotrophicus*, *Azospirillum* sp., *Klebsiella* sp., dan *Pseudomonas* sp. yang dapat menghasilkan enzim ekstraseluler berupa kitinase, lipase dan protease yang dapat mendegradasi dinding sel bakteri patogen dan menghambat pertumbuhannya.

BAHAN DAN METODA

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, Medan dengan ketinggian tempat ± 25 m dpl. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Desember 2014.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga faktor, yaitu: Faktor 1: Filtrat bakteri

Sejumlah bakteri endofit juga dapat menghasilkan antibiotik untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Hasil ekstraksi filtrat bakteri endofit juga banyak dilaporkan lebih baik efektifitasnya jika dibandingkan dengan pengaplikasian bakteri endofit. Filtrat merupakan senyawa kimia yang dihasilkan mikroorganisme untuk dapat menghambat dan meracuni pertumbuhan mikroba yang di kendalikan. Berbagai metode telah dilakukan untuk memperoleh filtrat murni seperti penggunaan sterilisasi membran, UV, gamma, dan alfa (Rosenblueth & Esperanza, 2006).

Disamping filtrat dan metode sterilisasi filtrat bakteri endofit juga sangat penting untuk para peneliti mengetahui dosis efektif penggunaan filtrat untuk mengendalikan penyakit blendok pada tebu. Konsentrasi filtrat yang tepat akan melahirkan pengendalian tepat sasaran, efektif dan ekonomis. Konsentrasi filtrat yang sangat pekat akan membuat pertumbuhan tanaman tidak seimbang dan sistem imun tanaman terganggu (de Matos, 2001). Sebaliknya konsentrasi filtrat yang sangat sedikit akan menyebabkan patogen dapat tetap berkembang di atas ambang ekonomi, sehingga sangat dibutuhkan penelitian yang mengkaji kombinasi dan pengaruh filtrat bakteri endofit, metode sterilisasi dan konsentrasi filtrat bakteri endofit untuk mengendalikan penyakit blendok pada tanaman tebu.

endofit yang terdiri atas tiga taraf, yaitu: F1= Filtrat B2, F2= Filtrat B7, dan F3= Filtrat B9, Faktor 2: Metode sterilisasi filtrat, yaitu: M1= Filtrat tidak disterilisasi, M2= Filtrat disterilisasi dengan autoclave, M3= Filtrat disterilisasi dengan membran filter, Faktor 3: Konsentrasi Filtrat, K1= Konsentrasi 0,0001%, K2= Konsentrasi 0,001%, K3= Konsentrasi 0,01%, K4=Konsentrasi 0,1%, dengan tiga ulangan.

Pelaksanaan penelitian

Isolasi bakteri *X. albilineans*

Bagian tanaman tebu dari daun, batang dan akar yang terserang penyakit blendok bakteri *X. albilineans* dibersihkan dari kotoran yang melekat di bawah air mengalir, lalu dipotong dengan ukuran 2-3 cm. Setelah itu sampel direndam dengan etanol 70% selama 30 detik, kemudian direndam dengan 0,1% HgCl₂ selama 3 menit dan dibilas dengan air steril 2-3 kali (Gagne *et al.* 1987).

Sampel digerus dengan mortal steril dan diberikan \pm 1ml air steril, lalu tambahkan 9 ml air steril sebagai pengenceran pertama, selanjutnya dilakukan pengenceran sampai 10^{-3} . Diambil 0,1 ml suspensi, kemudian plating pada media NA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Setiap koloni tunggal yang tumbuh diisolasi sampai murni pada media XA untuk pencirian koloni *X. albilineans*.

Bakteri *X. albilineans*

Karakterisasi *X. albilineans* yang diamati meliputi morfologi koloni berupa warna, bentuk, tepian, gram, kenaikan permukaan, dan kepekatan warna koloni (Cappucino & Sherman 2005). Pengamatan dilakukan setelah 24 jam waktu inkubasi. Karakterisasi dilakukan berdasarkan buku identifikasi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.* 1994).

Postulat Koch's

Uji Postulat Koch's dilakukan dengan mengencerkan isolat murni bakteri *X. albilineans* berumur 2x24 jam menggunakan air steril hingga kerapatan 10^6 cfu/ml, kemudian diinokulasikan pada tanaman tebu sehat varietas BZ134 berumur 1-2 bulan setelah tanam dengan menggunakan gunting. Gunting dicelup pada suspensi bakteri kemudian gunting digunakan untuk menggunting daun tanaman ($\pm 0,5$ -2cm). Pengamatan dilakukan 1-4 minggu setelah inokulasi, apabila tanaman tebu mengalami infeksi

dan menunjukkan gejala yang sama dengan gejala awal maka bakteri tersebut dapat diperbanyak untuk pengujian di laboratorium dan rumah kaca.

Eksplorasi dan Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Tebu

Bakteri endofit diperoleh dengan cara mengeksplornya dari akar, batang, daun tanaman tebu sehat varietas BZ 134 asal PTPN II Sei Semayang. Sampel diambil dan dimasukkan secara terpisah dalam kantung plastik dan dibawa ke laboratorium. Isolasi bakteri endofit dilakukan dengan menimbang 1 gr masing-masing sampel. Setelah itu potongan sampel dibersihkan dari kotoran yang melekat dengan menggunakan air mengalir. Selanjutnya setiap sampel dipotong dengan ukuran 2-3 cm dan direndam dengan etanol 70% selama 30 detik, diikuti dengan 0,1% HgCl₂ selama 3 menit dan dibilas dengan air steril 2-3 kali (Gagne *et al.* 1987).

Masing-masing sampel digerus dengan mortal steril dan \pm 1 ml air steril. Setiap sampel dilakukan pengenceran sampai 10^{-3} . Diambil 0,1 ml suspensi dari pengenceran 10^{-3} , kemudian diplating pada media NA dan King's B, selanjutnya biakan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam (Hung dan Annapurna, 2004). Setiap koloni tunggal yang tumbuh direisolasi dan dibuat biakan murni (Schaad *et al.* 2001).

Uji Hipersensitif

Uji ini dilakukan untuk menentukan apakah isolat yang digunakan tergolong patogenik atau non patogenik terhadap tumbuhan. Uji dilakukan pada tanaman tembakau asal Balai BPTD Sampali. Tanaman dari pot tray dipindahkan dalam pot plastik yang telah berisi tanah dan disiram setiap hari, setelah tanaman tembakau berumur 1 minggu dilakukan pengujian. Pengujian dilakukan dengan cara gunting dicelup pada suspensi bakteri endofit (10^6 cfu/ml) kemudian gunting digunakan untuk menggunting

daun tembakau muda ($\pm 0.5-2$ cm). Perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Setelah itu dibungkus dengan plastik transparan dan diinkubasi pada suhu $24-26^{\circ}\text{C}$. Pengamatan dilakukan setiap hari, isolat yang patogenik akan menunjukkan gejala nekrotik pada daun yang digunting (Lelliot dan Stead, 1987).

Produksi metabolit bakteri endofit

Isolat bakteri endofit yang telah murni, ditumbuhkan dalam medium Nutrient Broth. Proses fermentasi bakteri endofit menggunakan medium Mueller-Hinton Broth (MHB). Media MHB biasa digunakan untuk mengetahui daya antibakteri dengan kandungan pepton (6 g), kasein (17,5 g), pati (1,5 g) dalam 1 liter air. Isolat yang diambil sebelumnya dipindahkan ke dalam 5 ml medium MHB. Kemudian dihomogenkan menggunakan tube stirrer hingga mencapai kekeruhan $0,5$ Mc Farland ($1,5 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$). Suspensi koloni bakteri tersebut kemudian diambil sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf yang telah berisi 9 ml medium MHB. Eppendorf yang telah berisi suspensi bakteri kemudian diinkubasi selama 2×24 jam pada suhu 30°C dan kecepatan 130 rpm. Setelah 2×24 jam, medium yang telah berisi suspensi bakteri kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dengan menggunakan mikro pipet steril dan dimasukkan ke dalam vial steril. Supernatan tersebut yang akan digunakan sebagai uji aktivitas antibiotik (Utami *et al.* 2008).

Uji kandungan senyawa metabolit sekunder

Uji alkaloid

Sampel sebanyak 1 ml ditambahkan dengan 5 tetes kloroform dan beberapa tetes Pereaksi Mayer (Pembuatan Pereaksi Mayer yaitu dengan satu gram KI dilarutkan dalam 20 ml

aquades hingga larut kemudian larutan tersebut ditambahkan dengan HgCl_2 hingga larut). Adanya endapan putih menandakan adanya alkaloid.

Uji saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara, sebanyak 2 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan aquades. Campuran tersebut kemudian dikocok dengan kuat selama 10 menit. Terbentuknya busa atau buih menandakan adanya saponin.

Uji flavonoid

Sampel sebanyak 1 ml ditambahkan dengan 1 gram bubuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

Uji tanin

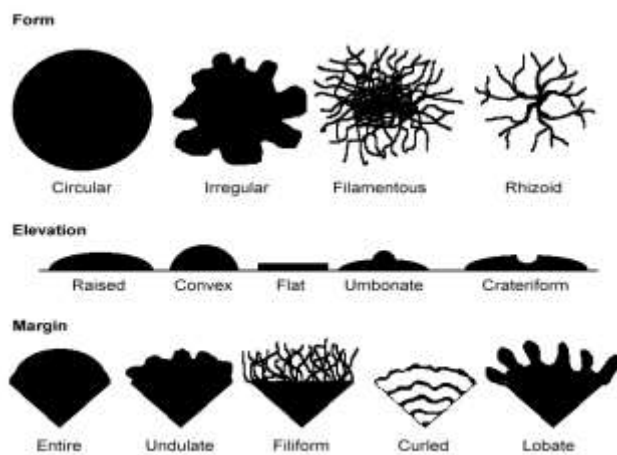
Uji tanin dilakukan dengan memasukkan sebanyak 1 ml sampel ke dalam tabung reaksi. Sampel kemudian ditambahkan dengan FeCl_2 5%. Adanya perubahan warna menunjukkan adanya senyawa tanin (fenolik).

Uji terpenoid

Uji terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara, sebanyak 1 ml sampel ditambahkan dengan 1 ml CH_3COOH glasial dan 1 ml H_2SO_4 pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

Karakterisasi Bakteri Endofit

Bakteri endofit yang didapat dikarakterisasi dengan melihat ciri makroskopis dan mikroskopis meliputi uji morfologi (Gambar1), fisiologi dengan panduan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.* 1994).



Gambar 1. Morfologi koloni bakteri
Sumber: <http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project>

Seleksi Bakteri Endofit Penghasil *Crude Antibiotik*

Satu koloni biakan bakteri pada media NA yang berumur 48 jam diambil dengan menggunakan ose dan mengkulturkannya pada 100 ml media NB dan diinkubasi selama 48 jam di atas shaker dengan kecepatan 130 rpm (Sunarmi, 2010). Selanjutnya biakan disaring dengan kertas Whatman 041 untuk mendapatkan suspensi antibiotik. Suspensi antibiotik disentrifugasi dengan kecepatan 3800 rpm selama 20 menit. Supernatan dibagi menjadi tiga bagian (A, B dan C) dan diambil untuk sterilisasi dengan cara yaitu sterilisasi autoclave, membran filter dan kontrol (tanpa disterilisasi) (Pavitra *et al.* 2012).

a. Sterilisasi Autoclave

Supernatan A dimasukkan ke erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas steril dan aluminium foil, disterilkan dalam autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit. Hasil tersebut adalah suspensi antibiotik yang digunakan untuk melakukan ekstraksi *crude* antibiotik.

b. Sterilisasi Membran Filter

Supernatan B disterilisasi dengan membran filter ukuran pori 0,45µm dan 0,22µm sehingga mikroba tertahan dalam pada filter tersebut. Filter ini sebelumnya

telah disterilkan dengan autoclave. Hasil tersebut adalah suspensi antibiotik yang telah steril digunakan untuk melakukan ekstraksi *crude* antibiotik (Abimbola, 2014).

c. Tanpa sterilisasi

Supernatan C dimasukkan ke erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas steril dan aluminium foil, tanpa disterilisasi (kontrol). Hasil tersebut adalah suspensi antibiotik yang digunakan untuk melakukan ekstraksi *crude* antibiotik.

Ekstraksi *Crude Antibiotik*

Suspensi antibiotik diekstraksi dengan pelarut *Chloroform* dengan perbandingan 1:1 (v/v). Campuran pelarut dan suspensi antibiotik dihomogenkan sebelum dimasukkan ke dalam corong pemisah, kemudian didinginkan kedalam lemari pendingin selama 4 jam pada suhu 9-10 °C untuk optimalisasi pengikatan pelarut terhadap suspensi antibiotik (Tawiah *et al.* 2012). Campuran pelarut dan suspensi antibiotik ditampung dalam *beaker glass* (yang telah ditimbang beratnya) dan diuapkan sampai kering hingga diperoleh endapan (*crude* antibiotik) yang perlu diketahui beratnya dengan cara menimbang kembali berat *beaker glass* untuk mengetahui berat antibiotik yang diperoleh. Endapan *crude* antibiotik yang didapatkan diencerkan dengan alkohol 96 % dan simpan botol universal sebagai cairan stok (Abimbola, 2014).

Berat *crude* antibiotik = berat kotor *beaker glass* – berat bersih *beaker glass*.

Pengujian Antagonis *Crude Antibiotik* Bakteri Endofit dengan *X. albilineans* di Laboratorium

Pengujian dilakukan antara *X. albilineans* dengan antibiotik bakteri endofit yang didapat dalam satu cawan petri yang berdiameter 9 cm. Uji antagonisme dilakukan dengan cara mengkulturkan *X. albilineans* ke dalam media NA dalam suhu ruang, kemudian dituang pada satu cawan petri. Uji

aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen dilakukan dengan metode uji Kirby-Bauer menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dibuat dari kertas saring Whatman 041 dengan cara memotongnya dengan alat pelubang kertas sehingga didapatkan kertas cakram dengan diameter 6 mm (Cappucino dan Sherman, 1996).

Secara aseptik, kertas cakram yang sudah disterilkan direndam di dalam supernatan kultur bakteri endofit selama 30 menit. Kertas cakram diambil dengan menggunakan pinset steril, kemudian dидiamkan hingga kering sebelum diletakkan pada permukaan media Na yang telah berisi mikroba uji. Selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengamatan terhadap zona bening yang terbentuk dan diukur diameternya. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antimikroba ditunjukkan dengan adanya zona bening. Pertumbuhan bakteri diamati setiap hari setelah inokulasi (hsi) selama 3 hari (Noverita *et al.* 2009).

Zona hambat adalah daerah yang terbentuk karena adanya kemampuan bakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen maupun uji antibiotik. Adapun penghitungan zona hambat yang digunakan menurut Davis Stout (1971) dalam Hardiningtyas (2009), yaitu sebagai berikut:

Tabel 1. Zona hambat menurut Davis Stout (1971) dalam Hardiningtyas (2009)

Diameter daerah hambatan	Kriteria
≥20 mm	potensi sangat kuat
10-20mm	potensi kuat
5-9mm	potensi sedang
≤5mm	Lemah

Peubah Amatan

Karakterisasi bakteri endofit

Bakteri endofit yang didapat diidentifikasi dengan melihat ciri makroskopis dan mikroskopis meliputi uji

morfologi (Gambar 1) dan fisiologi dengan panduan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

Zona Hambat

Pengamatan dilakukan dengan mengukur zona bening yang dihasilkan bakteri endofit terhadap *X. albilineans*. Setelah masa inkubasi diameter zona bening di sekitar cakram diukur dengan menggunakan kertas millimeter. Aktivitas antibiosis bakteri endofit dapat dilihat dengan adanya zona bening di sekitar cakram. Zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram diukur diameter vertikal dan diameter horizontal dengan satuan milimeter (mm). Zona hambat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Zona hambat} = A - B$$

Keterangan :

A= Diameter zona bening yang terbentuk (mm)

B= Diameter kertas cakram (mm)

(Rante *et al.* 2013).

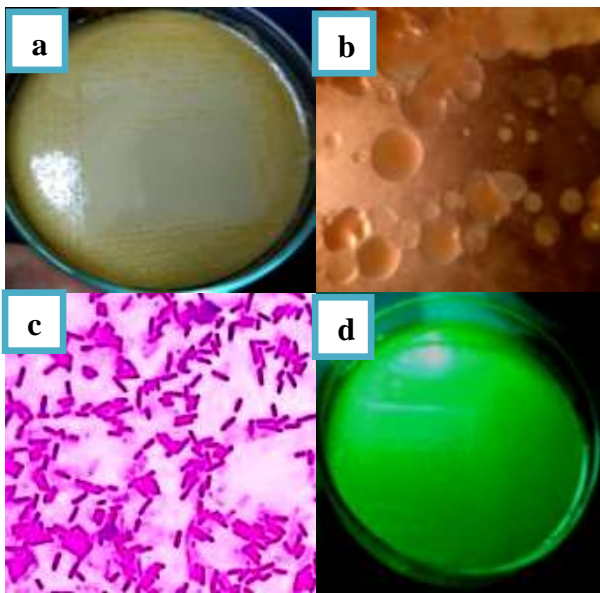
HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri *X. albilineans*

Hasil isolasi dan identifikasi bakteri dari daun, batang dan akar tanaman tebu yang bergejala diduga terinfeksi *X. albilineans* dengan menggunakan buku identifikasi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.* 1994) didapat koloni bakteri berbentuk bulat dengan warna kuning, elevasi koloni cembung (Gambar 2b) dengan margin (pinggiran) bergelombang dan berlendir (Gambar 2a). Hasil pengujian gram negatif dengan bentuk sel basil (batang) (Gambar 2c).

Ciri-ciri seperti yang diuraikan di atas merupakan ciri-ciri untuk bakteri *X. albilineans*. Hal ini diperkuat dengan pendapat Ou (1985) yang menyatakan bahwa *Xanthomonas* adalah bakteri yang

berbentuk batang dengan kedua ujung membulat, berukuran pendek, dengan panjang berkisar antara 0,7-2,0 μm dan lebar antara 0,4-0,7 μm , memiliki satu flagel, tanpa spora. Ciri khas genus *Xanthomonas* adalah koloninya berlendir, dan menghasilkan pigmen berwarna kuning yang merupakan pigmen xanthomonadin dengan bentuk koloni pada medium biakan adalah bulat, cembung dan berdiameter 1-3 mm.

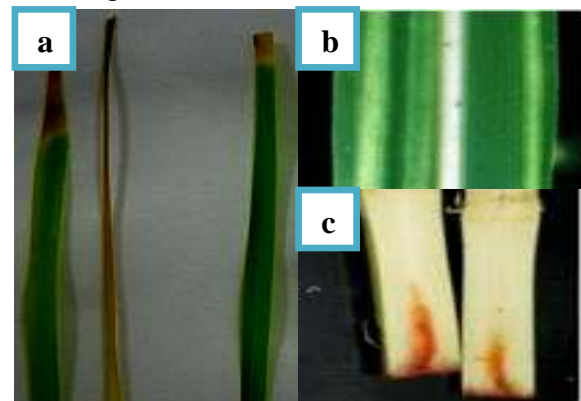


Gambar 2. (a) *X. albilineans* berwarna kuning kotor pada medium XA, (b) pengamatan morfologi koloni *X. albilineans* dibawah mikroskop stereo perbesaran 40 x, (c) pengamatan bentuk sel dan warna sel serta pewarnaan KOH 3% dengan mikroskop kompaund perbesaran 1000x dan (d) uji pendar fluor dibawah lampu UV.

Postulat Koch's

Dari hasil pengamatan yang dilakukan 1-4 minggu setelah inokulasi tanaman tebu mengalami infeksi dan menunjukkan gejala yang sama dengan gejala awal (Gambar 7a) yaitu terdapat klorosis pada daun yang mengikuti alur pembuluh dan lama kelamaan jalur klorosis ini menjadi kering. Pieretti *et al.* (2009) menyatakan penyakit *X. albilineans* ini ditandai dengan gejala serangan timbulnya klorosis pada daun

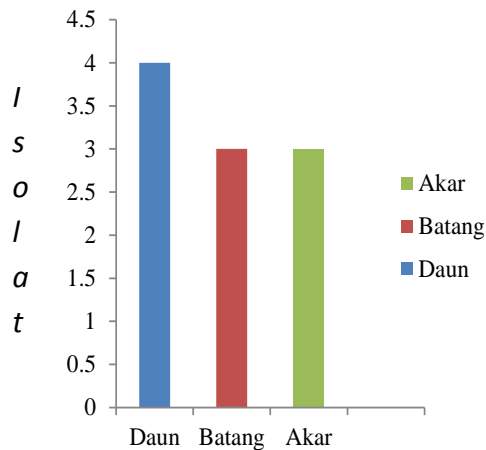
yang mengikuti alur pembuluh. Jalur klorosis ini lama-lama menjadi kering (Gambar 3a). Penyakit vaskular bakteri terlihat kira-kira 6 minggu hingga 8 minggu setelah tanam. Jika daun terserang berat, seluruh daun bergaris-garis hijau dan putih (Gambar 3b). Jika batang tanaman dibelah, tampak berkas-berkas pembuluh terdapat blendok yang berwarna kuning sampai merah tua (Gambar 3c) (Semangun, 2008).



Gambar 3. (a) serangan *X. albilineans* pada daun tebu muda membentuk nekrotik dari ujung, tepi menuju pangkal daun, (b) gejala klorosis pada daun tua yang berbentuk seperti stip pensil memanjang mengikuti tulang daun dan (c) serangan *X. albilineans* pada pangkal batang membentuk noda merah memanjang

Eksplorasi dan isolasi bakteri endofit dari tanaman tebu

Dari hasil eksplorasi bakteri endofit dari tanaman tebu diperoleh 10 isolat bakteri endofit yaitu 4 isolat berasal dari daun tanaman tebu dengan kode isolat B1, B2, B3, dan B4, 3 isolat berasal dari batang tanaman tebu dengan kode B5, B6, dan B7 dan 3 isolat berasal dari akar tanaman tebu dengan kode isolat B8, B9 dan B10 (Gambar 4).



Gambar 4. Jumlah bakteri endofit terisolasi dari daun, batang dan akar tanaman tebu.

Uji hipersensitif

Hasil uji hipersensitif kesepuluh isolat bakteri endofit yang dilakukan pada tanaman tembakau diperoleh hasil yaitu respon hipersensitif menunjukkan tidak terdapat gejala penyakit pada tanaman tembakau (tanaman sehat). Jaringan daun tembakau yang telah diinokulasi dengan suspensi bakteri tetap terlihat sehat dan tidak menunjukkan adanya nekrotik pada tanaman tembakau setelah diinkubasi 7 hari (Gambar 5). Berdasarkan uji tersebut, diketahui bahwa, bakteri yang berhasil diisolasi dari akar, batang dan daun tanaman tebu tidak menimbulkan nekrotik pada daun tanaman tembakau (bersifat non patogenik).



Gambar 5. Uji hipersensitif pada daun tembakau setelah inkubasi 7 hari B1- B10

Karakterisasi Bakteri Endofit

Selanjutnya ke-10 isolat bakteri endofit tersebut diidentifikasi hasil selengkapnya adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Karakteristik bentuk morfologi koloni dan fisiologi bakteri endofit

Kode Isolat	Ciri koloni					
	Bentuk	Warna	Elevasi	Margin	Gram	Bentuk
B1	Tidak beraturan	Putih	Raised	Bergelombang	-	Basil/streptobacil
B2	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B3	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B4	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B5	Bulat	Kuning	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B6	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B7	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B8	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B9	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B10	Tidak beraturan	Putih	rata	Bergelombang	-	Basil/monobacil

Dari hasil penelitian yang diperoleh bentuk umum mikroba terdiri dari satu sel (uniselluler), bentuk lain berupa koloni yaitu gabungan dua sel atau lebih di dalam satu ruang. Bentuk ini merupakan ciri khas bagi suatu spesies tertentu. Variasi bentuk pada sel bakteri adalah bulat (kokus), batang/ bulat memanjang (basil) dan lengkung. Variasi bentuk yang kerap terjadi baik secara tetap ataupun sebagai bentuk kelainan karena pengaruh lingkungan. Bentuk bakteri juga dapat dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu. Bahkan akibat pengaruh lingkungan yang tidak menguntungkan, faktor makanan, dan suhu, bakteri dapat mengalami bentuk involusi yaitu bentuk sementara yang terjadi karena lingkungan yang menguntungkan (Ilyas 2001).

Menurut Lay (1994), pewarnaan gram berguna untuk membedakan gram positif dan gram negatif. Perbedaan hasil pewarnaan disebabkan oleh adanya perbedaan struktur kedua kelompok bakteri tersebut sehingga menyebabkan perbedaan reaksi dalam permeabilitas zat warna dan penambahan larutan pemucat. Sebagian besar dinding sel bakteri gram

negatif terdiri dari kandungan lipida yang tinggi dibandingkan gram positif.

Bakteri endofit mencegah perkembangan penyakit karena memproduksi siderofor (Kloepper *et al.* 1980), menghasilkan senyawa metabolit yang bersifat racun bagi patogen (Schnider-Keel *et al.* 2000), atau terjadinya kompetisi ruang dan nutrisi (Kloepper *et al.* 1999). Bakteri endofit juga memiliki kemampuan untuk mereduksi produksi toksin yang dihasilkan oleh patogen sehingga tidak patogenik terhadap tanaman atau menginduksi ketahanan tanaman terhadap serangan patogen (M'Piga *et al.* 1997). Sturz *et al.* (2000) menyatakan bahwa ada bakteri endofit yang memiliki potensi mengurangi efek penyakit yang polisiklik dengan cara memperlambat laju perkembangan penyakit.

Bakteri endofit mempunyai prospek yang baik sebagai agensia hayati, baik untuk serangga hama maupun untuk patogen penyebab penyakit tanaman karena mereka tidak harus bersaing dalam ekosistem yang baru dan kompleks. Kelebihan lainnya, terkadang endofit juga mampu sebagai perangsang tumbuh,

pemicu inang untuk memproduksi fitoaleksin, bertahan dalam kondisi stres. Perkembangan penyakit dapat dihambat oleh endofit karena adanya siderofor atau senyawa metabolit yang beracun bagi patogen, atau terjadinya kompetisi ruang dan nutrisi, mereduksi produksi toksin yang dihasilkan oleh patogen sehingga tidak patogenik terhadap tanaman atau menginduksi ketahanan tanaman terhadap serangan patogen. Pengendalian patogen oleh bakteri endofit dapat melalui anticendawan atau antibakteri, siderofor, kompetisi terhadap nutrisi, menginduksi ketahanan tanaman secara sistemis atau meningkatkan ketersediaan hara tanaman (Sturz *et al.* 2000; Sessitsch *et al.* 2004).

Uji Aktifitas Antagonisme Bakteri Endofit terhadap *X. albilineans* di Laboratorium

Hasil pengujian menunjukkan 10 isolat bakteri endofit yang diuji yaitu: B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, dan B10 diperoleh 3 isolat bakteri endofit yang mampu menghambat *X. albilineans* dengan diameter zona bening ≥ 20 mm (skala paling baik) (Tabel 4). Ketiga isolat itu adalah B2 yaitu dengan diameter zona bening sebesar 20,1560 mm, B7 sebesar 21,5133 mm B9 sebesar 23,5633 mm (Gambar 6).

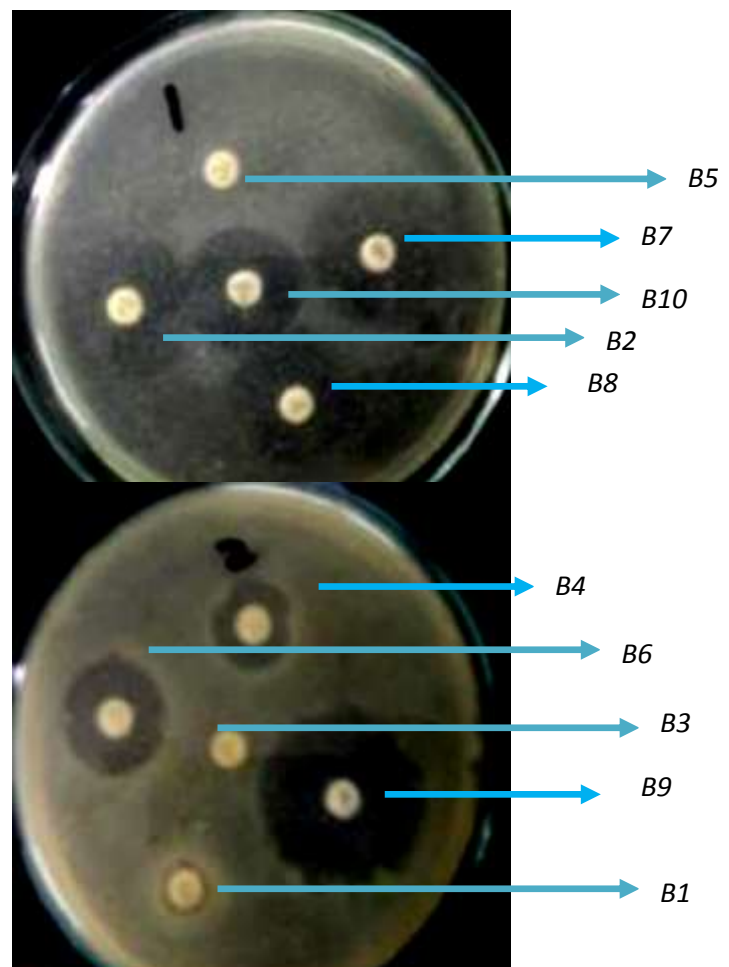
Tabel 4. Uji Aktifitas Antagonisme Bakteri Endofit terhadap *X. albilineans* di Laboratorium

Jenis bakteri	Diameter zona bening (mm)
B1	10,2267g
B2	20,1560c
B3	9,560h
B4	10,550g
B5	9,2600h
B6	11,5576f
B7	21,5133b
B8	12,9300e
B9	23,5633a
B10	13,9333d

Keterangan : Angka yang diikuti notasi huruf yang sama pada tabel yang sama

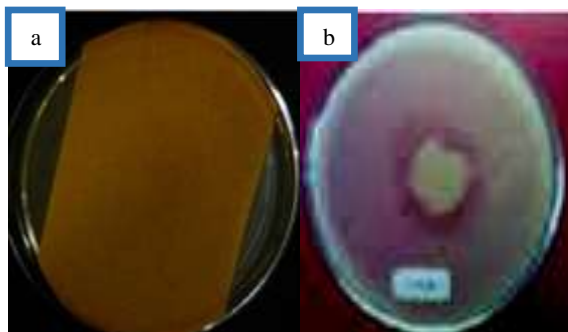
tidak berbeda nyata pada uji jarak Duncan 5 %.

Hasil penelitian menunjukkan suspensi bakteri endofit yang memiliki zona hambat terbesar terdapat pada suspensi bakteri endofit B9. Hal ini dikarenakan kemampuan bakteri ini menghasilkan metabolit sekunder berupa HCN (Gambar 7) yang merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat bakterisidal dan bakteri statis. Senyawa tersebut berkorelasi dengan aktifitas antagonis secara *in vitro*. HCN yang dihasilkan golongan *Pseudomonas* sp telah dilaporkan oleh (Widodo, 1993) dapat mengendalikan *Phyrium ultimum* pada tanaman bit gula dan akar gada pada caisin (Wiyono, 2003).



Gambar 6. Uji aktifitas antagonisme bakteri endofit terhadap *X. albilineans* di laboratorium

Suspensi bakteri endofit terbaik selanjutnya terdapat pada perlakuan bakteri endofit B7. Hal ini dikarenakan bakteri ini memiliki metabolit sekunder berupa enzim proteolitik (Gambar 7). Enzim ini akan melisis dinding sel bakteri yang mengandung susunan protein kompleks dan sederhana. Hal yang sama juga dinyatakan oleh Siddiqui & Shaukat (2003) bahwa filtrat bakteri endofit *Alcaligenes faecalis* menghasilkan enzim protease yang dapat mendegradasi sel patogen tanah yang mengandung protein. Protease akan merombak protein menjadi senyawa asam organik dan senyawa yang lebih sederhana.



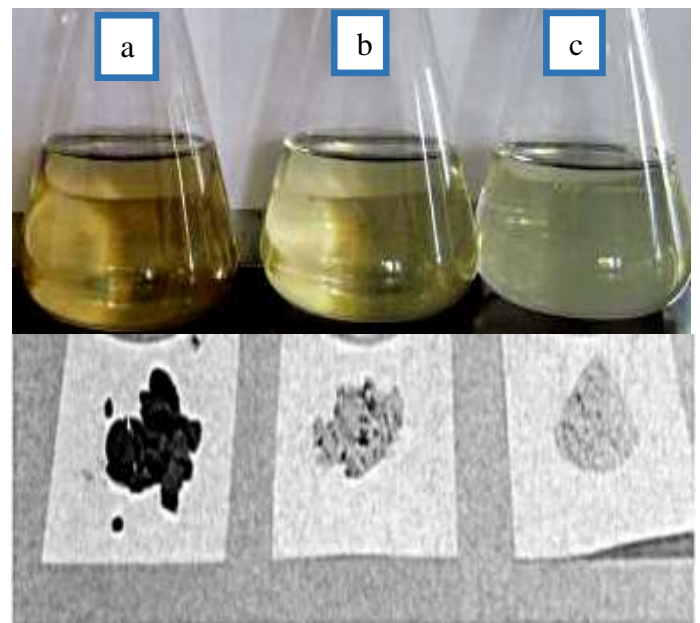
Gambar 7. (a) pengujian bakteri endofit B9 menghasilkan senyawa HCN sehingga kertas saring berwarna jingga dan (b) bakteri endofit B7 menghasilkan senyawa proteolitik sehingga menjernihkan medium Skim Milk Agar.

Suspensi bakteri endofit terbaik ketiga terdapat pada isolat B2, bakteri ini menghasilkan antibiotik β -laktamase dan Ofloxacin yang aktif melawan sebagian besar bakteri gram positif dan gram negatif aerob. Antibiotik ini berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara memperlama pertumbuhan bakteri dan melepaskan molekul racun disekeliling kapsul bakteri. Hal yang sama juga dinyatakan oleh Dexa Medica (2009) yang menyatakan *Agrobacterium radiobacter* menghasilkan senyawa antibiotik golongan β -laktamase dan Ofloxacin yang aktif melawan sebagian besar bakteri gram positif dan gram negatif aerob.

Bakteri yang memiliki diameter zona bening lebih kecil dari 20 mm tidak diikuti sertakan untuk tahap penelitian selanjutnya guna mendapatkan bakteri yang memiliki potensi tertinggi mengendalikan *X. albilineans* pada tanaman tebu. Ketiga bakteri yang memiliki potensi tertinggi kemudian akan dipersiapkan untuk di ekstraksi filtratnya.

Isolasi filtrat dan pengujian sifat kimia filtrat

Ketiga bakteri endofit (B9, B7, dan B2) yang telah ditapis dengan uji aktifitas antagonismenya (zona bening yang dihasilkan bakteri endofit ≥ 20 mm) di laboratorium kemudian dimasukkan ke dalam medium kultur filtrat. Filtrat yang telah diperoleh kemudian dipurifikasi dan diformulasikan dalam bentuk kristal (*Crude*) (Gambar 8).



Gambar 8. Ekstraksi filtrat bakteri endofit dan pembuatan *crude* filtrat bakteri endofit (a) B9, (b). B7 dan (c). B2

Filtrat kemudian diuji kandungan kimianya dengan metode hidrolisis bahan kimia dan pemisahan senyawa aktif. Hasil pemeriksaan antara lain:

Tabel 5. Uji kandungan kimia dengan metode hidrolisis bahan kimia dan pemisahan senyawa

Uji	B2	B7	B9
Alkaloid	+	-	+
Saponin	-	+	-
Flavonoid	-	+	-
Tannin	-	+	+
Terpenoid	+	+	+

Hasil pengujian *crude* filtrat bakteri endofit B2 menghasilkan senyawa alkaloid dan terpenoid, B7 mengandung senyawa saponin, flavonoid, tannin dan terpenoid dan B9 mengandung senyawa alkaloid, tannin dan terpenoid. Berdasarkan hasil dari penelitian diduga bahwa bakteri endofit B2 termasuk ke dalam genus *Agrobacterium* spp, bakteri endofit B7 termasuk ke dalam genus *Alcaligenes* spp, dan bakteri endofit B9 termasuk ke dalam genus *Pseudomonas* sp. Hal ini sesuai dengan pernyataan Dexa Medica (2009) yang menyatakan *Agrobacterium* spp. menghasilkan alkaloid dan terpenoid yang berfungsi untuk menghambat penyebaran patogen tular tanah dan berfungsi sebagai penolak pertumbuhan pada sebagian bakteri gram negatif dan merusak jaringan tubuh, bakteri *Alcaligenes* spp. menghasilkan metabolit sekunder golongan tannin dan terpenoid yang dapat meningkatkan induksi dan ketahanan sel terhadap penetrasi berbagai patogen tular tanah dan *Pseudomonas* sp. menghasilkan senyawa turunan berupa alkaloid, tannin dan terpenoid.

Pengaruh Metode Sterilisasi dan Konsentrasi Filtrat Bakteri Endofit terhadap *Xanthomonas albilineans* Secara *In Vitro* 3 Hsi (mm)

Hasil pengujian 3 isolat bakteri endofit terhadap *X. albilineans* menunjukkan kemampuan antibiosis terhadap *X. albilineans* dengan diameter penghambatan yang bervariasi. Analisis

sidik ragam menunjukkan bahwa nilai zona hambat bakteri endofit berpengaruh nyata terhadap *X. albilineans*. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Pengaruh metode sterilisasi dan konsentrasi filtrat bakteri endofit terhadap *X. albilineans* secara *In Vitro* 3 Hsa (mm)

Perlakuan	Luas zona hambat (mm)
Filtrat B2 kontrol konsentrasi 0,0001%	5,000u
Filtrat B2 kontrol konsentrasi 0,001%	7,333t
Filtrat B2 kontrol konsentrasi 0,01%	8,333s
Filtrat B2 kontrol konsentrasi 0,1%	9,000rs
Filtrat B2 autoclave konsentrasi 0,0001%	9,333qr
Filtrat B2 autoclave konsentrasi 0,001%	9,667pqr
Filtrat B2 autoclave konsentrasi 0,01%	10,000opq
Filtrat B2 autoclave konsentrasi 0,1%	11,000n
Filtrat B2 filter konsentrasi 0,0001%	10,667no
Filtrat B2 filter konsentrasi 0,001%	11,000n
Filtrat B2 filter konsentrasi 0,01%	10,667no
Filtrat B2 filter konsentrasi 0,1%	10,667no
Filtrat B7 kontrol konsentrasi 0,0001%	10,000opq
Filtrat B7 kontrol konsentrasi 0,001%	10,333nop
Filtrat B7 kontrol konsentrasi 0,01%	11,333mn
Filtrat B7 kontrol konsentrasi 0,1%	12,000m
Filtrat B7 autoclave konsentrasi 0,0001%	12,000m
Filtrat B7 autoclave konsentrasi 0,001%	12,333lm
Filtrat B7 autoclave konsentrasi 0,01%	12,333lm
Filtrat B7 autoclave konsentrasi 0,1%	12,667klm
Filtrat B7 filter konsentrasi 0,0001%	12,667klm
Filtrat B7 filter konsentrasi 0,001%	13,000jkl
Filtrat B7 filter konsentrasi 0,01%	13,333ijk
Filtrat B7 filter konsentrasi 0,1%	13,667hij
Filtrat B9 kontrol 0,0001%	13,000jkl
Filtrat B9 kontrol 0,001%	13,333ijk
Filtrat B9 kontrol 0,01%	13,333ijk
Filtrat B9 kontrol 0,1%	13,667hij
Filtrat B9 autoclave 0,0001%	14,333gh
Filtrat B9 autoclave 0,001%	15,000fg
Filtrat B9 autoclave 0,01%	15,667ef
Filtrat B9 autoclave 0,1%	16,000e
Filtrat B9 filter 0,0001%	17,333d
Filtrat B9 filter 0,001%	18,667c
Filtrat B9 filter 0,01%	20,333b
Filtrat B9 filter 0,1%	23,000a

Keterangan : Angka yang diikuti notasi huruf yang sama pada tabel yang sama tidak berbeda nyata pada uji jarak Duncan 5 %.

Data pada Tabel 6 menunjukkan diameter zona hambat tertinggi pada kombinasi perlakuan filtrat B2 dengan metode sterilisasi membran filter konsentrasi 0,1% pada 3 his yaitu sebesar 23,00 mm dan terendah terdapat pada

perlakuan tidak disterilisasi (kontrol) konsentrasi 0,0001% dengan zona hambat sebesar 5,00 mm. Hal ini dikarenakan metode sterilisasi filtrat dengan menggunakan membran filter, partikel benda asing dan sel bakteri akan tersaring secara sempurna pada pori-pori filter, sehingga dihasilkan metabolit sekunder yang murni dan tanpa kontaminan. Hal ini sesuai dengan Dhadhang & Teuku (2012) yang menyatakan prinsip teknik filtrasi membran ini adalah dengan menyaring cairan sampel melewati saringan yang sangat tipis dan yang terbuat dari bahan sejenis selulosa. Membran ini memiliki pori-pori berukuran mikroskopis dengan diameter lebih kecil daripada ukuran sel mikroba pada umumnya.

Metode sterilisasi filtrat B2 dengan membran filter konsentrasi 0,1% merupakan konsentrasi terbaik dalam penelitian ini. Hal ini sangat bergantung pada konsentrasi minimum daya hambat filtrat terhadap *X. albilineans*. Pada perlakuan ini konsentrasi daya hambat minimum (MIC) terdapat pada konsentrasi 0,0001% dan konsentrasi daya hambat tertinggi terdapat pada konsentrasi filtrat 0,1%. Semakin menuju optimum konsentrasi filtrat akan berkorelasi positif terhadap MIC bakteri patogen. Hal ini sesuai dengan pernyataan Jawetz *et al.* (1996) konsentrasi minimum penghambatan atau lebih dikenal dengan MIC (Minimum Inhibitory Concentration) adalah konsentrasi terendah dari antibiotika atau antimikrobia yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba tertentu.

Pada perlakuan filtrat B7 dengan metode sterilisasi membran filter konsentrasi 0,1% sebesar 13,66 mm dan pada konsentrasi 0,0001% sebesar 12,66 mm. Hal ini karena B7 merupakan bakteri yang dapat menghasilkan saponin, flavonoid, tannin dan terpenoid yang dapat merusak sistem biokimia dan metabolisme bakteri patogen. Saponin adalah glikosida triterpenoid dan sterol. Beberapa saponin juga bekerja sebagai antimikroba

(Robinson, 1995). Senyawa saponin dapat bersifat antibakteri dengan merusak membran sel. Rusaknya membran menyebabkan substansi penting keluar sel dan juga dapat mencegah masuknya bahan-bahan penting ke dalam sel. Jika fungsi membran sel dirusak maka akan mengakibatkan kematian sel (Monalisa *et al.* 2011). Oesman *et al.* (2010) menyatakan bahwa saponin adalah senyawa polar yang keberadaannya dalam tumbuhan dapat diekstraksi dengan pelarut semi polar dan polar.

Steroid adalah senyawa organik lemak sterol tidak terhidrolisis yang dapat dihasilkan dari reaksi penurunan dari terpena atau skualena (steroid). Monalisa *et al.* (2011) menyatakan dalam penelitiannya bahwa senyawa steroid yang terkandung dalam ekstrak daun tapak liman merupakan senyawa antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* dengan konsentrasi ekstrak daun tapak liman 20%. Mekanisme kerja antibakteri senyawa steroid yaitu dengan cara merusak membran sel bakteri.

Triterpenoid adalah senyawa yang mempunyai struktur siklik yang relatif kompleks, kebanyakan merupakan suatu alkohol, aldehid atau asam karboksilat. Senyawa tersebut tidak berwarna, kristalin, sering mempunyai titik lebur tinggi, Triterpen dapat ditemukan pada resin, kulit kayu, dan dalam lateks (Sirait, 2007). Menurut Heinrich *et al.* (2009), triterpen juga merupakan komponen resin dan eksudat resin dari tanaman yang diproduksi jika tanaman menjadi rusak sebagai perlindungan fisik terhadap serangan fungi dan bakteri. Selain itu, banyak komponen terpenoid resin ini memiliki aktivitas antimikroba yang tinggi, baik membunuh mikroba yang berpotensi menyerang maupun memperlambat pertumbuhannya hingga tanaman dapat memperbaiki kerusakannya.

Flavanoid umumnya terdapat pada tumbuhan sebagai glikosida. flavanoid

terdapat pada seluruh bagian tanaman, termasuk pada buah, tepung sari, dan akar. Kegunaan flavanoid untuk tumbuhan diantaranya adalah untuk menarik serangga, yang membantu proses penyerbukan dan untuk menarik perhatian binatang yang membantu penyebaran biji (Sirait, 2007). Monalisa *et al.* (2011) juga menyatakan bahwa senyawa flavonoid dapat menggumpalkan protein, senyawa flavonoid juga bersifat lipofilik, sehingga dapat merusak lapisan lipid pada membran sel bakteri.

Filtrat bakteri endofit yang memiliki zona hambat terkecil adalah B2, filtrat bakteri ini telah dianalisis mengandung senyawa kimia alkaloid, tannin dan terpenoid. Senyawa alkaloid bersamaan dengan fenolik yang dihasilkan bersifat penolak kehadiran mikroorganisme patogen tanaman dan meningkatkan daya tahan dan ketebalan sel. Reaksi ini berlangsung lama dan membutuhkan beberapa simbiosis bakteri atau fungi di dalam jaringan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sirait (2007) yang menyatakan alkaloid adalah senyawa kimia tanaman hasil metabolisme sekunder, yang terbentuk berdasarkan prinsip pembentukan campuran. Alkaloid dapat ditemukan pada daun, kuncup muda, akar, pada getah yang diproduksi di tabung-tabung getah dalam epidermis dan sel-sel yang langsung di bawah epidermis seperti pada korteks. Rustaman *et al.* (2006) menyatakan bahwa alkaloid merupakan senyawa organik siklik yang mengandung nitrogen dengan bilangan oksidasi negatif yang penyebarannya terbatas pada makhluk hidup.

Alkaloid juga merupakan golongan zat metabolit sekunder yang terbesar, yang pada saat ini telah diketahui sekitar 5500 buah. Fenolik merupakan senyawa yang mengandung fenol (senyawa turunan fenol) yang secara kimiawi telah diubah untuk mengurangi kemampuannya dalam mengiritasi kulit dan meningkatkan aktivitas antibakterinya. Aktivitas antimikroba senyawa fenolik adalah

dengan merusak lipid pada membran plasma mikroorganisme sehingga menyebabkan isi sel keluar (Pratiwi, 2008).

Tanin ditandai oleh sifatnya yang dapat menciutkan dan mengendapkan protein dari larutan dengan membentuk senyawa yang tidak larut (Sirait, 2007). Kadar tanin yang tinggi mungkin mempunyai arti pertahanan bagi tumbuhan, membantu mengusir hewan pemangsa tumbuhan. Beberapa tanin terbukti mempunyai aktivitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tumor dan menghambat enzim seperti enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase.

Tanin tersebar luas dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Dalam industri tanin adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mampu mengubah kulit hewan yang mentah menjadi kulit siap pakai karena kemampuannya menyambung silang protein. Di dalam tumbuhan letak tanin terpisah dari protein dan enzim sitoplasma. Sebagian besar tumbuhan yang banyak bertanin dihindari oleh hewan pemakan tumbuhan karena rasanya yang sepat (Rustaman *et al.* 2006). Secara garis besar tanin terbagi menjadi dua golongan: tanin dapat terhidrolisis, yang terbentuk dari esterifikasi gula (misalnya glukosa) dengan asam fenolat sederhana yang merupakan tanin turunan sikimat (misalnya asam galat), dan tanin tidak terhidrolisis yang kadang disebut tanin terkondensasi yang berasal dari reaksi polimerasi (kondensasi) antar flavanoid (Heinrich *et al.* 2009).

Pada perlakuan sterilisasi dengan metode autoclave filtrat B9, B7, dan B2 perlakuan ini tidak lebih baik dari sterilisasi membran filter dikarenakan pada suhu tinggi antibiotik akan mengalami pecah rantai kimia dan akan menurunkan efektivitas filtrat bakteri endofit. Beberapa senyawa bergolongan protein juga akan mengalami denaturasi pada suhu 121 °C. Hal yang sama juga

dinyatakan oleh Fennema (1996) yang menyatakan denaturasi merupakan proses perubahan konfigurasi molekul protein sehingga terjadi perubahan atau rusaknya struktur sekunder, tersier dan kuaternernya tanpa menyebabkan kerusakan ikatan peptide. Ada dua macam denaturasi, pengembangan polipeptida dan pemecahan protein menjadi unit yang lebih kecil tanpa disertai pengembangan molekul. Terjadinya kedua jenis denaturasi ini tergantung pada keadaan molekul. Pertama terjadi pada rantai polipeptida, sedangkan yang kedua terjadi pada bagian-bagian molekul yang tergabung dalam ikatan sekunder.

Selain sifat-sifat yang umum, kebanyakan protein alam masih mempunyai satu atau lebih sifat khusus. Sifat khusus tersebut misalnya : (a) daya angkut oksigen; (b) mempunyai daya sebagai alat pengangkut lipida; (c) mempunyai kelarutan tertentu dalam garam encer atau asam encer; dan (d) mempunyai aktivitas sebagai enzim atau hormon. Protein tersebut yang dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu yang panas dan dingin, sinar ultraviolet, gelombang ultrasonik, pengocokan yang kuat, suasana asam dan basa yang ekstrim, kation logam berat, penambahan garam jenuh, serta bahan kimia seperti aseton, alkohol, dan sebagainya dapat mengalami proses denaturasi. Denaturasi protein akibat kondisi panas dapat memutuskan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik non polar yang menopang struktur sekunder dan tersier molekul protein. Hal ini di karenakan suhu tinggi dapat meningkatkan energi kinetik dan menyebabkan molekul penyusun protein bergerak atau bergetar sangat cepat sehingga menyebabkan sisi hidrofobik dari gugus samping molekul polipeptida akan terbuka. Proses denaturasi tersebut menurunkan kelarutan protein sehingga akan terjadi koagulasi. Denaturasi dapat mengubah sifat protein alam, dan untuk bermacam-macam protein, perubahan ini tidak seidentik menurut jenis proteinnya,

misalnya (a) aktivitas enzim atau hormon berkurang; (b) kelarutan dalam garam-garam atau asam-asam encer menurun; (c) kemampuan membentuk kristal berkurang; dan (d) stabilitasnya menurun sehingga menggumpal (Damasceno *et al.* 2008).

Dampak yang terjadi pada produk yang mengalami denaturasi dapat terjadi perubahan seperti berkurang kelarutannya. Lapisan molekul protein bagian dalam yang bersifat hidrofobik akan keluar, sedangkan bagian yang hidrofilik akan terlipat ke dalam. Pelipatan atau pembalik akan terjadi bila larutan protein mendekati pH isoelektris yaitu pH dimana protein memiliki muatan positif dan negatif yang sama, lalu protein akan menggumpal dan mengendap (Santoso, 2008).

Metode sterilisasi filtrat terendah terdapat pada perlakuan kontrol. Hal ini dikarenakan pada perlakuan ini filtrat tidak disterilisasi. Pada perlakuan kontrol filtrat dan sel bakteri bercampur dengan partikel asing sehingga menyebabkan filtrat tidak murni dan daya hambat menjadi paling rendah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fennema (1996) yang menyatakan kemurnian filtrat sangat berpengaruh pada daya hambatnya terhadap bakteri dan daya simpan filtrat. Semakin banyak kontaminan dan ketidak murnian filtrat akan menyebabkan penurunan efikasi filtrat dan perubahan molekul filtrat lebih sederhana akibat adanya perombakan bahan kimia oleh mikroba tertentu.

SIMPULAN

Tiga isolat yang menghasilkan zona bening ≥ 20 mm pada pengujian *in vitro* adalah B9, B7, dan B2. Diameter zona hambat tertinggi dari bakteri endofit tersebut adalah pada perlakuan filtrat B9 dengan metode sterilisasi membran filter konsentrasi 0,1% pada 3 hsi yaitu sebesar 23,00 mm.

DAFTAR PUSTAKA

- Abimbola, I.O. 2014. The effect of autoclaving and membrane filtration on the antimicrobial activities of *Alchornea cordifolia* leaf extract. *J. Microbiol.* 4(1):6–9.
- Azevedo JL, Maccheroni JR, Pereira W, Luiz JO, de Araújo W. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic .of Bio-technology* .3(1):40–65pp.
- Birch RG. 2001. *Xanthomonas albilineans* and The Anti Pathogenesis Approach to Disease Control. *Molecular Plant Pathology* .2 (1): 10-11pp.
- BPPT. 2007. Melihat Industri Tebu Indonesia. *Artikel budidaya tebu lahan kering*. 1(3)1-12pp.
- Cappuccino SM & Sherman N. 1996. Microbiology: A Laboratory Manual 4 th Ed. Addison- Wesley Publishing Company.
- Cappuccino SM & Sherman N. 2005. Microbiology: A Laboratory Manual 4 th Ed. Addison- Wesley Publishing Company.205-245pp.
- Damsceno AS, Mironova GD, Shigaeva MI, Belosludtseva, Gritsenko EN, Belosludtsev KN, Germanova EL. 2008. Effect of several flavonoid-containing plant preparations on activity of mitovhondrial ATP-dependent potassium channel. 146(2): 195–9pp.
- de Matos N. 2001. Expression of Sugarcane Genes Induced By InoculationWith *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genet Mol Biol.* 24:199-206 pp.
- Dexa Medica. 2010. Bahaya Resistensi Antibiotika. *Jurnal farmakologi dan kesehatan*. 2(3):7-8pp
- Dhadhang & Teuku. 2012. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*.33:1-8pp.
- Dirjenbun. 2011. Kebutuhan gula nasional tahun 2014. *Artikel Direktorat Jenderal Perkebunan*. Sumatera Utara. 1-34pp
- Duncan, WJ.1971.Statistict methode .Boston: Houghton Mif Flin Coy. 12-123 pp.
- Fennema. 1996. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*.33:1-8 pp.
- Gagne S., Richard C., Rousseau H & Antoun. 1987. Xylem- Residing Bacteria in Alfalfa Roots. *Can J. Microbial.* 33 : 996-1000.
- Hardiningtyas, SD. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak *Sarcophyton* sp. yang Difragmentasi dan Tidak Difragmentasi Di Perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu.*SKRIPSI*. FMIPA. IPB.
- Heinrich, Saizarbitoria TC, Montilla L, Rodriguez M, Castillo A, Hasegawa M. Xymarginatin .2009. A new acetogenin inhibitor of mitochondrial electron transport from *Xylopia emarginata* Mart. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.19(4)pp.
- Holt JG, Krieg NR & Sneath PHA. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th.edition. Williams & Wilkins. Baltimore. 230-356pp.
- Ilyas S. 2001. Mikrobiologi Dasar. Diktat Kompilasi, Universitas Sumatera Utara Press, Medan. p 28.
- Jawetz SDX & Olivares D. 1996. Oxytetracycline dynamics on peach leaves inrelation to temperature, sunlight, and simulated rain. *PlantDis.*, 94, 1213–1218pp
- Kloepper, Wong, P.T.W., & Baker, R. 1980. Suppression of wheat take-all and *Ophiobolus* patch by

- fluorescent pseudomonads from a Fusarium-suppressive soil. Soil , Biol. Biochem.
- Kloepper. 1999. Resistance genes in agricultural ecosystems. *J. microbiol. Meth.*,86, 150–155pp.
- Lay BW. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Edisi pertama, Cetakan pertama. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Lelliott RA & Stead DE. 1987. Methodes For The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plant. Oxford: Blacwell scientific publications .23-56pp.
- M'Piga P., Bélanger RR., Paulitz TC & Benhamou N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28, Physiological and Molecular Plant Pathology 50: 301–320.
- Monalisa, Bubakar AR, Amiruddin MD. 2011. Clinical aspects fluopr albus of female and treatment. Departement of Dermatovenereology Medical Faculty of Hasanuddin University.1(1): 20pp.
- Noverita., Dinah F & Ernawati S. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit dari daun Rimpang *Zingiber ottensii*. *Jurnal Farmasi Indonesia Vol. 4* No. 4: 171-176.
- Oesman, Cushnie TP, Hamilton VE, Lamb AJ. Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiological research*.158(4):281–9pp.
- Ou SH. 1985. *Rice Disease*. Commonwealth. Inst. Kiew, Surrey, England. 368 pp.
- Pieretti I., Royer M., Barbe V., Carrere S., Koebnik R., Cociancich R., Couloux A., Dassaresse., Gouzy., Jacques J., Lauber MA., Manceau E., Mangenot S., Segurens., Szurek S., Arlat M & Rott P. 2009. The Complete Genome Sequence of *Xanthomonas albilineans* Provides new Insight Into The reductive genome Evolution of the Xylem Limited Xanthomonadaceae. *Bmc genomic*. 10 (616) : 1-5pp.
- Pratiwi AS. 2008. Mikrobiologi. Rajawali Press Jakarta. 7-54pp.
- Rante H., Taebe B & Intan S. 2013. *Isolasi Fungi Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba dari Daun Cabai Katokkon (Capsicum Annuum L Var.Chinensis) dan Profil Klt Bioautografi*. Majalah Farmasi dan Farmakologi Vol. 17, No.2. Makassar.
- Rosenblueth M & Esperanza M-R. 2006. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Mol Plant Microbe Interact* 19 : 827–837pp.
- Rott P, Champoiseau P & Dougrois JH. 2009. Epiphytic Populations of *Xanthomonas albilineans* and Subsequent Sugarcane stalk Infection are Linked to Rainfall in Guadeloupe. *Plant Dis*. 93: 339-346pp.
- Robinson.1995. Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry.*, 1998;48: 1087-1117pp.
- Rott P., Champoiseau P & Dougrois JH. 2009. Epiphytic Populations of *Xanthomonas albilineans* and Subsequent Sugarcane stalk Infection are Linked to Rainfall in Guadeloupe. *Plant Dis*. 93: 339-346.
- Rustaman, Arabski M, Wegierek-Ciuk A, Czerwonka G, Lankoff A, Kaca W. 2006 Effects of saponins against clinical Escherichia colistrains and eukaryotic cell line.1–6pp.
- Santoso WA. Membuat Kebun Tanaman Obat. Niaga Swadaya. 136pp.

- Schaad NW., Jones JB & Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, St Paul, Minnesota : Aps Press.
- Schnider-Keel U., Seematter A., Maurhofer M., Blumer C., Duffy BK., Gigot-Bonnefoy., Reimann C., Notz., Defago R., G Hass D & Keel C. 2000. Autoinduction of 2,4-diacetylphoroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin, *Journal of Bacteriology* 182:1.215–1.225.
- Semangun H. 2008. Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan Di Indonesia, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, UGM Press, Yogyakarta. 599- 602pp.
- Sessitsch A., Reiter B & Berg G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Can. J. Microbiol* 50:239-249.
- Siddiqui I.A. & Shaukat S.S., 2003. Plant species, host age and host genotype effects on *Meloidogyne incognita* bio- control by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its genetically-modified derivatives. *Journal of Phytopathology*, 151: 231-238pp.
- Sirait JS 2007. Resints :Padigm of a successful bacterial transmitted organism. *BrJ Biomed Sci*62(4):193-200.25pp.
- Strobel G., Daisy B., Castillo U & Harper J. 2004. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *J Nat Prod*. 67 : 257-268pp.
- Statistik Perkebunan Indonesia Komoditas Tebu .(SPIKT /2013-2015). Laporan SPIKT. *Bulletin BPS Tebu*. Lampung. 1-39 pp
- Sturz AV., Christie BR & Nowak J. 2000. Bacterial Endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production, *Critical Reviews in Plant Sciences* 19:1–30.
- Tan RX & WX Zou. 2001. Endophytes : a rich source of functional metabolites. *Nat Prod. Rep.* 18 : 448-459pp.
- Tawiah AA., Gbedema SY., Adu F., Boamah VE & Annan K. 2012. Antibiotic Producing Microorganisms from River Wiwi, Lake Bosomtwe and the Gulf of Guinea at Doakor Sea Beach, Ghana *BMC Microbial* 12 : 234.
- Utami U, Soemarno, Sumarno, & Yenny R. 2008. Aktivitas Anti Bakteri Endofit Tanaman Mangrove terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Penelitian Perikanan*. Vol. 11. nomor 1. 42-48p.
- Widayati WE. 2011. Bakteri Endofit Khusus Tebu dapat Meningkatkan Kadar dan Bobot Gula. *Artikel Produksi gula*. Lampung. 12-23pp.
- Widayati WE, Joko W & Joedoro S. 2007. Deteksi Molekular Bakteri Endofit pada Jaringan Planlet Tebu Molecular Detection of Endophytic Bacteria on Plantlet Tissue of Sugarcane, Hayati *Journal of Biosciences* Vol. 14(4):145-149pp.
- Widodo. 1993. Penggunaan *Pseudomonas* Kelompok *Fluorescens* untuk Mengendalikan Penyakit Akar Gada pada Caisin (*Brassica campestris* var.*chinensis*). *Thesis Pasca Sarjana*. IPB, Bogor. 41 hal.
- Widodo & Suheri. 1995. Suppression of clubroot disease of cabbage by soil solarization. *Buletin pest and pathology management* .8(2):49–55pp. Widodo & Suheri. 1995. Suppression of clubroot disease of cabbage by soil solarization. *Buletin Hama Penyakit Tumbuhan* 8(2):49–55
- Wiyono, S. 2004. Optimation of biocontrol of damping off of sugar beet caused by *Pythium ultimum*

- Trow by using *Pseudomonas fluorescens* B5. *Dissertation*.
University of Gottingen
- Yulianti T. 2012. Menggali Potensi Endofit untuk Meningkatkan Kesehatan Tanaman Tebu Mendukung Peningkatan Produksi Gula. Malang. *Perspektif*. 11:(2)111-122pp.